

钙、镁离子和温度对吡喹酮损害日本血吸虫雄虫皮层的影响

肖树华 郭惠芳 (中国预防医学中心寄生虫病研究所*, 上海 200025)

戴志强 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

张荣泉 (上海市卫生局测试中心, 上海 200031)

提要 在无 Ca^{2+} 或高浓度 Mg^{2+} (30 mM) 的 HBS 中, 吡喹酮对血吸虫 σ^7 虫的皮层无明显损害或损害轻微。若将 Ca^{2+} 1.4 mM 加至无 Ca^{2+} 的 HBS 中, 则所有虫的皮层皆出现明显的损害。在 4 °C 时吡喹酮亦不损害虫的皮层, 但培养温度回升至 37 °C 时, 则所有虫的皮层均迅速出现明显损害。

关键词 日本血吸虫; 吡喹酮; 钙; 镁; 扫描电子显微镜

吡喹酮对血吸虫具有 3 个主要的药理作用, 即虫体活动兴奋^(1,2)、肌肉挛缩⁽²⁻⁴⁾和体表皮层损害^(5,6)。有关这些药理作用在药物杀虫过程中的意义则还不十分清楚。我们在体外观察吡喹酮对不同发育期曼氏血吸虫的作用时, 发现在药物的作用下, 虫的皮层损害具有期的特异性, 与吡喹酮对宿主体内不同发育期的血吸虫的疗效相一致⁽⁷⁾, 从而提示损害虫的皮层是吡喹酮的一个重要药理作用。本文系探讨影响吡喹酮损害日本血吸虫皮层的因素。

方 法

血吸虫成虫 取 18-22 g 的小鼠, 每鼠经腹部皮肤接种日本血吸虫尾蚴 100-150 条。小

1984 年 1 月 16 日收稿 1984 年 5 月 2 日修回

• 世界卫生组织疟疾、血吸虫病、丝虫病合作中心。本研究得到联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织热带病研究培训特别规划的部分支持。

鼠于感染后 32-40 d 剖杀, 用冰冷的 Hanks 盐平衡溶液(HBS)灌注肠系膜静脉, 收集血吸虫 σ^7 虫, 并用 HBS 洗涤 3 次, 然后进行体外培养。

药物配制和体外培养 吡喹酮系由本所药物化学研究室供给, 先用聚乙二醇(PEG 400)溶解, 然后用生理盐水稀释至所需浓度。在培养液内, 聚乙二醇的最终浓度不超过 0.003%。

培养液为 HBS、无 Ca^{2+} 的 HBS(HBS - Ca^{2+}) 和含 Mg^{2+} 10 或 30 mM 的 HBS (HBS + Mg^{2+} 10 mM 或 HBS + Mg^{2+} 30 mM)。取培养液 2 ml, 放置在培养皿内, 每皿培养 3-10 条 σ^7 虫, 在 37 °C 或 4 °C 中培养不同时间后加吡喹酮, 终浓度为 1 或 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。血吸虫经吡喹酮作用不同时间后, 用倒置显微镜观察虫的体表变化。各组试验进行 3-4 次, 观察的总虫数为 56-60 条。

扫描电镜观察 按前文⁽⁸⁾方法。

结 果

在 HBS 中吡喹酮对血吸虫皮层的损害 用倒置显微镜观察在 HBS 中培养 4 h 的血吸虫 σ^7 虫体表, 未见有异常变化。当加入吡喹酮 1 或 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 虫先有短暂的活动兴奋继而强烈挛缩。加药后 5 min, 少数虫的局部体表可查

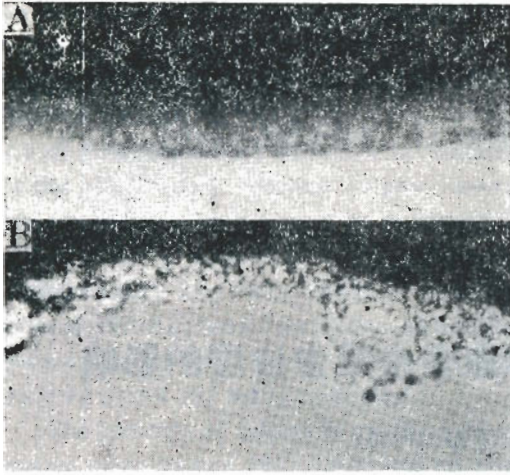


Fig 1. Microscopy of ♂ *Schistosoma japonicum* after 1 h incubation in HBS containing praziquantel 1 $\mu\text{g/ml}$. $\times 264$. A) 37°C, showing numerous vesicles appeared along the worm surface; B) 4°C, showing normal appearance of the worm surface.

见少量散在的细小泡状物, 15 min 后则所有虫的体表均出现一些小泡状物, 分布的部位亦有一些扩大; 1 h 后, 虫的体表泡状物明显增多增大(图 1 A), 内含液状和细粒状物, 且有一些泡状物已破裂. 经吡喹酮作用后, 虫的皮层泡状物多出现于尾和体部, 一般背侧皮层的泡状物的形成较抱♀沟褶缘的为早. 在上述时间内, 两种浓度的吡喹酮对血吸虫♂虫皮层的损害相仿.

血吸虫♂虫在 HBS 中经吡喹酮 1 $\mu\text{g/ml}$ 作用 15 min 后用扫描电镜观察, 其部分背侧皮层褶嵴的形貌即见紊乱, 有的褶嵴肿胀, 有的褶嵴变得低平, 以致褶嵴的间隙增宽, 而一些盘状感觉器则因褶嵴低平而突出于体表, 且变形似洞穴状, 其中的纤毛大都已脱落(图 2 A); 与此同时, 有的球状感觉器示有肿胀和糜烂. 在虫的尾背皮层, 有的褶嵴明显肿胀、融合和剥落, 致皮层下组织显露(图 2 B); 在虫的抱♀沟褶缘, 部分皮层亦有轻度肿胀, 或肿胀的褶嵴相互融合成条索状. 此外, 在虫的不同部位均可查见一些小泡状物, 部分则已破裂. 加药后 1 h, 虫的皮层损害加重, 皮层褶嵴的肿胀和融合更为明显, 并有较大的空泡状物形成.

Ca²⁺ 对吡喹酮损害血吸虫皮层的影响 血

吸虫♂虫在 HBS-Ca²⁺ 中培养 4 h 后用倒置显微镜观察, 除虫的活动稍有减弱外, 虫的体表无改变. 虫在 HBS-Ca²⁺ 中先培养 1 h 后加入吡喹酮 1 或 30 $\mu\text{g/ml}$ 时, 虫先呈短暂兴奋, 并迅速挛缩, 随后虫体又逐渐松弛伸长, 约 10 min 即已明显, 同时吸盘与虫体亦恢复一些活动. 加药后 15 min, 约 1/3 的♂虫局部体表出现少量的细小泡状物; 1 h 后约半数虫的体表查见有泡状物, 分布亦较局限, 与 HBS 相应组的差别明显, 血吸虫♂虫在 HBS-Ca²⁺ 中经吡喹酮作用 1 h 后, 将正常的含 Ca²⁺ 量 1.4 mM 加入, 虫体迅速挛缩, 15 min 后, 自所有虫的体表均查见许多泡状物, 或较加入 Ca²⁺ 前明显增多.

在 HBS-Ca²⁺ 中培养 1 h 的♂虫, 于加入吡喹酮 1 $\mu\text{g/ml}$ 后 15 min 用扫描电镜观察, 有的虫体体表形貌无明显变化(图 2 C); 有的局部示有褶嵴轻度肿胀, 间或有局灶性融合, 或有许多细小粒状物自褶嵴皮孔处冒出(图 2 D), 少数虫在背侧或抱♀沟褶缘等处查见少量泡状物; 感觉器大部分正常, 少数有一些肿胀. 加药后 1 h, 在一些部位的正常皮层中较普遍地夹有肿胀或融合的褶嵴, 个别可形成表面光滑的隆起(图 2 E); 有的部位的褶嵴虽无明显肿胀, 但排列紊乱, 并有一些泡状物形成.

Mg²⁺ 对吡喹酮损害血吸虫皮层的影响

血吸虫♂虫先在 HBS + Mg²⁺ 30 mM 中培养 30 min 并于加入吡喹酮 1 或 30 $\mu\text{g/ml}$ 后用倒置显微镜观察, 虫亦有短暂的兴奋和挛缩, 随即逐渐伸长. 加药后 15-60 min 有近 1/3-1/2 的虫的体表有一些泡状物形成, 有的体表则较粗糙. 若 Mg²⁺ 的浓度为 10 mM, 则虫的皮层在加药 15-30 min 后皆出现皮层损害, 但较 HBS 相应组的轻一些.

在 HBS + Mg²⁺ 30 mM 中先培养 30 min 的♂虫于加入吡喹酮 1 $\mu\text{g/ml}$ 后 15 min 用扫描电镜观察, 部分虫的体表无明显变化(图 2 F), 部分虫的局部皮层褶嵴有轻度肿胀和排列紊乱, 并有少量泡状物形成. 加药后 1 h 除部分虫的一些皮层未见有明显变化外, 其余虫的皮层褶

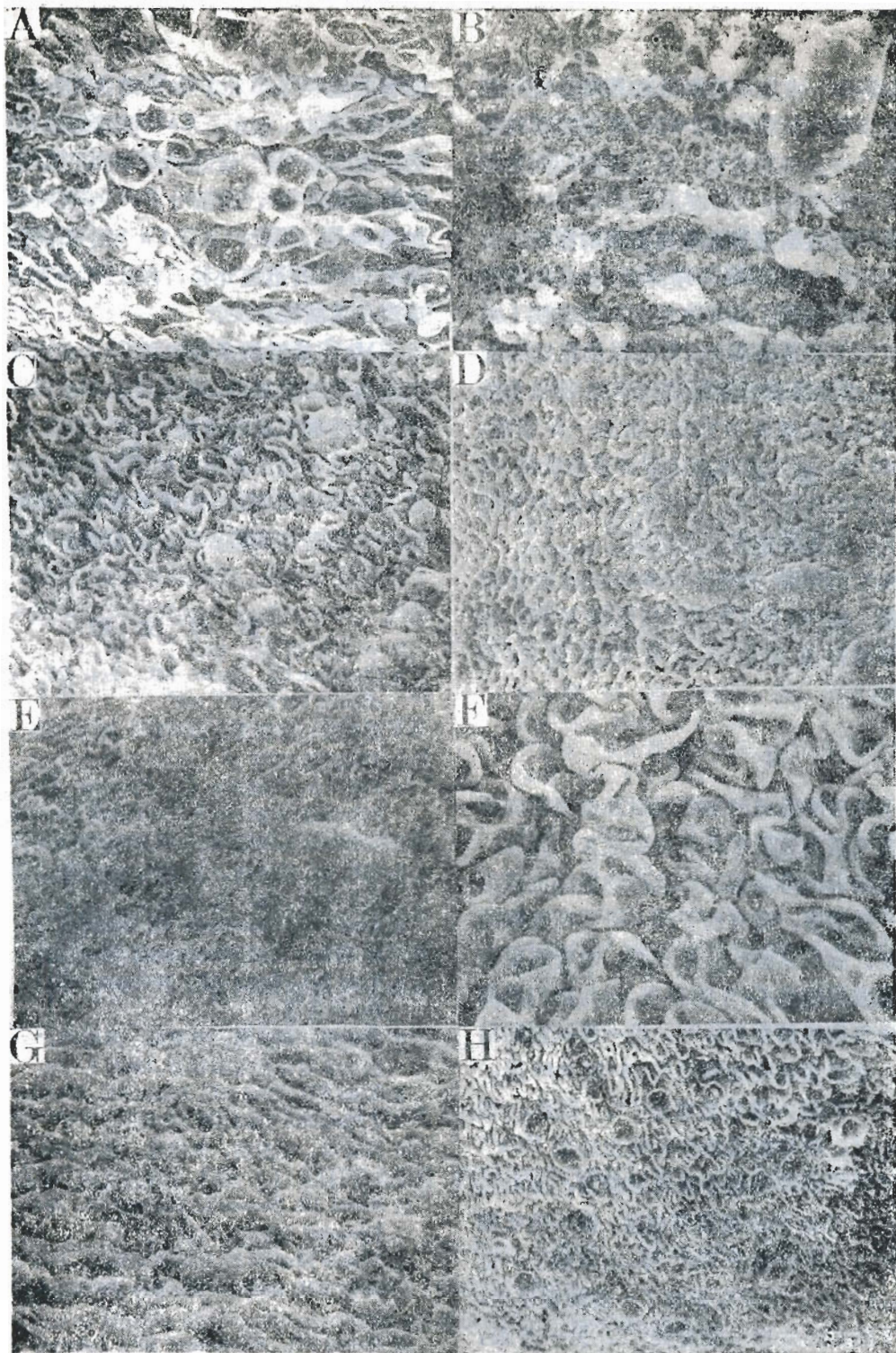


Fig 2. Scanning electron microscopy of ♂ schistosomes maintained in various media containing praziquantel 1 $\mu\text{g/ml}$. A) 15 min in HBS, showing swelling of tegument, space increase in ridges, erosion of sensory organs as well as detachment of sensory cilia $\times 2800$; B) 1 h in HBS, showing peeling of the worm surface and exposure of subtegumental tissues $\times 3600$; C) 15 min after incubation in HBS without Ca^{2+} , showing normal appearance of worm tegument $\times 3600$; D) 15 min in HBS without Ca^{2+} , showing numerous granular materials emerged from tegumental ridges and pores $\times 2800$; E) 1 h in HBS without Ca^{2+} , showing local swelling of tegument $\times 3600$; F) 15 min after incubation in HBS with Mg^{2+} 30 mM, showing normal appearance of worm tegument $\times 8400$; G) 1 h in HBS with Mg^{2+} 30 mM, showing mild swelling of ridges with some filament materials on the surface $\times 3600$; H) 1 h in HBS at 4 $^{\circ}\text{C}$ showing normal appearance of worm tegument $\times 2400$.

嵴呈轻度肿胀,或在一些肿胀的褶嵴上有一些丝状物和少量泡状物(图2G),甚或在褶嵴和皮孔内查见许多细粒状物。在上述时间内虫的感觉器无明显变化。

低温对吡喹酮损害血吸虫皮层的影响 血吸虫♂虫在4℃的HBS中培养时,虫体中度挛缩,活动明显减弱。30min后加入吡喹酮1或30μg/ml并于持续培养1-2h后用倒置显微镜观察,未见虫的体表有变化(图1B)。部分虫的培养温度自4℃增至37℃时,虫进一步挛缩,15-30min后,在虫的体表出现许多泡状物。培养在4℃中的对照♂虫,在温度回升至37℃时虫体伸长,并逐渐恢复正常活动。

在4℃的HBS中培养30min的♂虫于加入吡喹酮1μg/ml后1h用扫描电镜观察,虫的皮层褶嵴和感觉器未见有明显变化(图2H)。

讨 论

由于吡喹酮迅速而强烈地损害血吸虫皮层的作用在其杀虫过程中具有重要意义,因此,应用体外培养的方法探讨影响药物损害血吸虫皮层的一些因素,将有助于深入研究吡喹酮的作用机制。我们试验的结果表明,吡喹酮损害血吸虫的皮层需有Ca²⁺的存在,这与我们用曼氏血吸虫观察的结果相仿⁽⁹⁾。进一步试验的结果证明,血吸虫经吡喹酮作用10-30min后,虫对⁴⁵Ca²⁺的摄入量明显增加⁽¹⁰⁾。但是,由于在4℃时,吡喹酮虽然亦可使虫的摄⁴⁵Ca²⁺量明显增加,但不引起虫的皮层损害,而当温度回升至37℃时则出现皮层损害,提示吡喹酮损害虫的皮层除依赖于Ca²⁺外,还依赖于一定的温度。这可能在低温时影响了一些酶促反应,或改变了膜脂的生理功能有关⁽¹¹⁾。另一方面,又由于在无Ca²⁺的培养液中,血吸虫的⁴⁵Ca²⁺

的释放量较培养在含Ca²⁺的培养液中的为多⁽¹⁰⁾,同时,虫在无Ca²⁺的培养液中培养1h后,虫的总Ca²⁺量减少约30%⁽¹²⁾。这说明在虫的总Ca²⁺中,有部分Ca²⁺是可进行交换的游离Ca²⁺。因此,在无Ca²⁺的培养液中,虫的游离Ca²⁺的迅速外流,可能与吡喹酮损害虫的皮层作用减轻有关。

Mg²⁺能拮抗多种依赖Ca²⁺的作用⁽¹³⁾。我们试验的结果表明,高浓度的Mg²⁺(30mM)可减弱吡喹酮引起的依赖于Ca²⁺存在的皮层损害,但其本身又是使虫的皮层不稳定的一个因素,即虫在高Mg²⁺浓度下培养约2h后,虫的体表可出现许多较大的丘状空泡。

参 考 文 献

- 1 Chavasse CJ, Brown MC, Bell DR. *Z Parasitenkd* 1979; 58: 169
- 2 肖树华、邵葆若、徐月琴、潘秋如. 药学报 1980; 15: 105
- 3 Pax RA, Bennett JL, Fetterer RH. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1978; 304: 309
- 4 Coles GC. *J Helminthol* 1979; 53: 31
- 5 肖树华、戴志强、张荣泉、薛海筹、邵葆若. 药学报 1982; 17: 498
- 6 Becker B, Mehlhorn H, Andrews P, Thomas H, Eckert J. *Z Parasitenkd* 1980; 63: 113
- 7 Xiao SH, Brian AC, Webster LT Jr. *J Infect Dis* 待发表
- 8 肖树华、戴志强、张荣泉、薛海筹、邵葆若. 寄生虫学与寄生虫病杂志 1983; 1: 23
- 9 Xiao SH, Paul AF, Brian AC, Webster LT Jr. *J Parasitol* 1984; 70: 177
- 10 肖树华、沈惠良、焦佩英. 药学报 1984; 19: 727
- 11 Kusel JR, Stones L, Harnett W. *Mol Biochem Parasitol* 1982; 5: 147
- 12 Wolde Mussie F, Vande Waa J, Pax RA, Fetterer RH, Bennett JL. *Exp Parasitol* 1982; 53: 270
- 13 Potter JD, Robertson SP, Johnson JD. *Fed Proc* 1981; 40: 2653

Acta Pharmacologica Sinica 1985 Mar; 6 (1): 59-63

EFFECT OF CALCIUM, MAGNESIUM AND TEMPERATURE ON PRAZIQUANTEL-INDUCED TEGUMENT DAMAGE OF MALE *SCHISTOSOMA JAPONICUM**

XIAO Shu-hua, GUO Hui-fang

(*Inst Parasitic Diseases, China National Centre for Preventive Medicine*, Shanghai 200025*)

DAI Zhi-qiang (*Shanghai Inst Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031*)

ZHANG Ron-quan

(*Measurement and Test Centre of Shanghai Municipal Health Bureau, Shanghai 200031*)

ABSTRACT When ♂ schistosomes were preincubated in Hank's balanced salt solution (HBS) without calcium for 1 h, followed by the addition of praziquantel at the final concentration of 1 or 30 µg/ml, about half of the worms tested appeared intact while others showed some vesicles along their surface within 1 h. After the addition of Ca²⁺ (1.4 mM) to the media, all worms exhibited strong contraction and vesicles appeared along the tegument within 15-30 min. Preincubation of ♂ schistosomes in HBS with 30 mM Mg²⁺ before the addition of praziquantel (1 or 30 µg/ml) prevented the formation of vesicles in about half of the worms tested within 1 h. At 4°C ♂ schistosomes showed moderate contraction and praziquantel exhibited little activity on them, but once re-

turned to 37°C, the worms recovered to normal. When ♂ schistosomes were exposed to praziquantel (1 or 30 µg/ml) in HBS at 4°C for 1-2 h, no vesicles were formed. However, when these worms were transferred to 37°C, a strong spasmodic contraction occurred and vesicles appeared along the tegument within 15-30 min.

KEY WORDS *Schistosoma japonicum*; praziquantel; calcium; magnesium; scanning electron microscopy

* WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis.

Partial financial support was received from UNDP/World Bank/WHO TDR.